

Study on the Antibacterial Activity and Promoting Skin Wound Healing Activities of Tea Tree Oil Nanoemulsion

QiuLin Wu*, Ting Guo*, Jinglei Li#

School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui
Email: #lijinglei2010@hotmail.com

Received: Feb. 9th, 2020; accepted: Feb. 18th, 2020; published: Feb. 25th, 2020

Abstract

Tea tree oil (TTO) is an essential oil extracted from *Melaleuca alternifolia* tea tree leaf and has significant antibacterial activity. In this study, tea tree oil was used as the oil phase, Tween 20 was used as the emulsifier, soybean phospholipids were used as co-emulsifiers, and distilled water was used as the water phase. O/W nanoemulsions were prepared by ultrasonic treatment, and chitosan was embedded to coat the TTO nanoemulsion. After the optimization of the conditions, the average diameter of the nanoemulsion is about 36 nm, and the PDI is less than 0.3, which indicates that the nanoemulsion has a concentrated distribution range and high stability. The zeta value of the nanoemulsion without chitosan coating was about -20 mV. After the chitosan coating treatment, the zeta value became about 15 mV, indicating that the chitosan was successfully coated. The antibacterial activity of the nanoemulsion was tested by the zone of inhibition, indicating that the nanoemulsion can significantly inhibit the growth of *E. coli* and *S. aureus*. Tea tree oil nanoemulsion can promote skin wound tissue healing to a certain extent, indicating that tea tree oil nanoemulsion has skin protection ability.

Keywords

Nanoemulsion, Tea Tree Oil, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, Skin Healing

茶树油纳米乳液抑菌活性以及促进皮肤创伤愈合作用研究

吴秋林*, 国 婷*, 李井雷#

*对本文贡献相同, 为共同第一作者。

#通讯作者。

合肥工业大学, 食品与生物工程学院, 安徽 合肥
Email: #lijinglei2010@hotmail.com

收稿日期: 2020年2月9日; 录用日期: 2020年2月18日; 发布日期: 2020年2月25日

摘要

茶树油是从互叶白千层茶树提取获得的精油, 具有显著的抑菌活性。本研究以茶树油作为油相, 吐温20作为乳化剂, 大豆磷脂作为助乳化剂, 蒸馏水作为水相, 利用超声波处理制备o/w型纳米乳液, 壳聚糖包埋处理乳液制备壳聚糖包埋纳米乳液。经过条件优化后, 纳米乳液平均直径为36 nm左右, PDI小于0.3, 表明纳米乳液分布范围集中, 稳定性较高。不经壳聚糖包埋的纳米乳液zeta值为-20 mV左右, 经过壳聚糖包埋处理后, zeta值变为15 mV左右, 说明壳聚糖包埋成功。抑菌圈检测纳米乳液的抑菌活性, 说明纳米乳液可以显著抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长。茶树油纳米乳液在一定程度上可以促进皮肤创伤组织愈合, 表明茶树油纳米乳液具有皮肤保护作用。

关键词

纳米乳液, 茶树油, 大肠杆菌, 金黄色葡萄球菌, 皮肤愈合

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

茶树油是从互叶白千层茶树树叶中通过蒸汽蒸馏提取的精油, 外观为透明淡黄色液体, 主要成分为挥发性物质、8-桉树油素和4-羟基萜烯, 具有温和的气味[1]。茶树油具有显著的抑菌、抗炎、抗癌等生物活性[1]。研究显示, 4-羟基萜烯含量是决定茶树油生物活性的主要物质。茶树油对于多种食源性和病原性微生物具有显著的生长抑制作用, 可以作用于微生物的细胞膜, 破坏细胞膜结构, 促进细胞质外流, 造成微生物死亡[2]。但是茶树油不能溶于水, 限制了其在食品以及其他领域的应用。

纳米乳液是由不相溶的水相和油相在乳化剂的作用下形成的动力学稳定的胶体系统[3]。超声波处理和超高压均质处理是制备纳米乳液的常用方法, 在低温条件下, 超声波作用可以促进油相和水相的互溶, 促进乳化剂覆盖在油水界面, 形成稳定的纳米乳液[4]。一般认为纳米乳液稳定性高于普通乳液, 粒径分布、表面电荷值、表面包埋层等性质对于纳米乳液的稳定性具有重要的影响。

本研究以茶树油作为油相, 通过超声波处理制备纳米乳液, 同时壳聚糖对纳米乳液进行包埋处理, 对纳米乳液的抑菌活性和皮肤创伤愈合促进作用进行了研究。

2. 材料与方法

2.1. 主要仪器与材料

茶树油, 吐温 20, 大豆磷脂(纯度大于 90%)购自阿拉丁, 壳聚糖(低粘度), 冰醋酸购自国药集团, UV-vis 吸光光度计(北京华科仪科技股份有限公司), 超声波破碎仪(上海豫明), 磁力搅拌器(南京舜玛), 超纯水机(上海茸研), DLS 激光粒度仪(ZS90, 英国马尔文), 其他常规药品购自国药集团。

2.2. 纳米乳液制备

茶树油纳米乳液制备过程参照文献, 并做一定修改[4]。将 5 g 吐温 20 和 1 g 大豆磷脂溶解于 90 mL 蒸馏水中, 磁力搅拌充分溶解后滴加 5 mL 茶树油, 900 rpm 继续磁力搅拌 1 小时, 制备粗乳液。将粗乳液转移至超声波破碎仪中, 设定功率为 350 W, 处理时间 10 分钟, 连续处理 5 秒间隔 1 秒, 乳液在冰水浴条件下处理。结束后, 转移至透明样品瓶保存。

2.3. 纳米乳液粒径、PDI 以及表面电荷值检查

使用马尔文激光粒度仪(Malvern Nano ZS90)检测乳液的粒径、PDI 和 zeta 表面电荷值。将乳液用移液枪转移至专用粒径测量池中, 检测波长为 630 nm, 测量乳液的平均粒径、PDI 和 zeta 值。

2.4. 抑菌圈法检测纳米乳液的抑菌活性

参照相关文献, 利用抑菌圈检测茶树油纳米乳液对两种代表性病原微生物的抑制作用[5]。首先, 液体细菌培养基培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 600 nm 测 OD 值, 将 OD 值调整到 1 左右, 吸取 0.1 mL 培养液, 均匀涂布在固体培养基上, 将提前灭菌的不锈钢牛津杯至于固体培养基中间, 移液器移去 0.1 mL 纳米乳液至不锈钢牛津杯中, 37°C 培养 24 小时, 观察抑菌圈, 并测量记录抑菌圈直径。

2.5. 最小抑菌浓度

参照相关文献, 检测纳米乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度[6]。液体细菌培养基培养大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 将 OD 值调整到 1 左右, 移液枪转移 0.1 mL 培养液到 9 mL 空白液体培养基中混合均匀, 然后加入经过稀释的纳米乳液, 充分混合, 培养 24 小时后于 600 nm 条件下测吸光值, 不接菌的培养液做对照, 吸光值为 0 的纳米乳液的浓度为最小抑菌浓度。

2.6. 纳米乳液对小鼠皮肤创伤的愈合促进作用

动物实验在合肥工业大学食品与生物工程学院动物实验室进行, 动物实验通过合肥工业大学实验动物伦理委员会的审查。28 只雄性昆明小鼠购自安徽医科大学实验动物中心, 平均体重 26 ± 2 g。将小鼠在动物实验室中饲养, 温度为 23 ± 2 °C 湿度为 $55 \pm 5\%$ 。将所有小鼠适应饲养 1 周, 然后分为 4 个实验组, 包括不进行治疗的对照组, 进行药物治疗的阳性组(结痂宁, 治疗烫伤的中草药煎药, 从当地药店购买), 茶树油纳米乳液组(TNE)和壳聚糖茶树油纳米乳液组(CTNE)治疗组。用动物专用电子剃毛刀去除小鼠背部的毛发, 形成 4 厘米 \times 3 厘米的无毛区域。参照报道方法建立皮肤烫伤小鼠模型, 对脱毛的皮肤用蘸有 90°C 热水的棉球烫伤[7]。从第二天起, 将 TNE (用等体积的 1% 乙酸稀释), CTNE 和草药每天两次分别施用于各组小鼠的烫伤皮肤, 对照组用蒸馏水治疗, 实验持续时间为 18 天。在实验期间监测烫伤皮肤组织的面积大小和体重。实验结束时, 将烫伤皮肤组织用苏木精和曙红(H & E)染色后, 并在光学显微镜下观察。

3. 结果与讨论

3.1. 纳米乳液的制备

超声波处理过程中, 粗乳液发生破碎分离, 粒径逐渐减小, 经一定功率和处理一定时间后可以形成纳米乳液。与粗乳液或微乳液相比, 纳米乳液外观更加透明, 透光性增加。在本研究条件下, 经过 10 分钟的超声波处理后, DLS 检测纳米乳液的直径为 36 nm 左右。PDI 值用来表征纳米乳液的粒径分布情况, PDI 越大说明乳液的粒径分布越分散, 预示纳米乳液容易发生分层或沉淀等现象; 反之 PDI 值小于 0.3

一般认为纳米乳液分布较为集中,也预示稳定性较高。本研究纳米乳液的 PDI 为 0.15 左右,说明纳米乳液分布非常集中,稳定性较高。Zeta 值用来表征纳米乳液的表面电荷性质,绝对值越大说明其相互之间电荷排斥力也越大,乳液系统也越稳定。一般认为 zeta 绝对值在 25 mV 以上则预示乳液系统非常稳定[8]。本研究纳米乳液的 zeta 值为-20 mV,因此后期利用壳聚糖对纳米乳液进行了包埋处理。

壳聚糖可以溶解于 1%醋酸溶液以及其他酸性溶液里,由于带有氨基,因此在溶液中带有正电荷,广泛用于纳米递送体系的包埋等处理。壳聚糖包埋处理不仅可以改变纳米乳液的表面电荷性质,还可以赋予纳米乳液表面一层多糖包埋层,由于空间位阻作用,提高纳米乳液的稳定性。经过壳聚糖包埋后,纳米乳液的粒径为 38 nm,有所上升,PDI 值没有明显变化,为 0.16, zeta 值变为 15 mV,进一步验证了壳聚糖成功对纳米乳液进行包埋。

与传统微乳液相比,纳米乳液粒径小,布朗运动强烈,动力学稳定性较高,经过室温贮藏稳定性试验,发现室温条件下贮藏 1 个月后主要理化参数没有明显改变,说明茶树油纳米乳液和壳聚糖包埋纳米乳液的稳定性较高。

3.2. 纳米乳液的抑菌活性

茶树油具有显著的抑菌活性,可以抑制多种食源性和病原性微生物的生长,一般认为作用机理为茶树油中的 4-羟基萜烯与微生物的细胞膜结合,破坏细胞膜结构,促进细胞质流出,杀死微生物。本研究选取革兰氏阴性和阳性菌代表大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,使用透明圈法检测其抑菌活性。结果显示,茶树油纳米乳液和经过壳聚糖包埋的茶树油纳米乳液对选择的两种微生物都具有显著的抑菌活性(表 1)。

纳米乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈分别为 26.6 mm 和 24.3 mm;壳聚糖纳米乳液处理后,抑菌圈显著扩大,分别为 30.3 mm 和 27.3 mm,可能由于壳聚糖本身具有显著抑菌活性,经过壳聚糖包埋后增加了茶树油纳米乳液的抑菌能力。

Table 1. Inhibition zone result of tea tree oil to *E. coli*, *Staphylococcus aureus*

表 1. 茶树油纳米乳液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌圈结果

纳米乳液	微生物	抑菌圈大小(mm)			均值(mm)
纳米乳液	大肠杆菌	28	26	26	26.6 ± 0.9
	金黄色葡萄球菌	26	23	24	24.3 ± 1.2
壳聚糖包埋纳米乳液	大肠杆菌	30	32	29	30.3 ± 1.2
	金黄色葡萄球菌	27	29	26	27.3 ± 1.2

通过检测纳米乳液的最小抑菌浓度,可以确定纳米乳液作为抑菌剂的使用浓度。结果显示,针对大肠杆菌,纳米乳液和壳聚糖纳米乳液的最小抑菌浓度均为 0.8 mg/mL,针对于金黄色葡萄球菌,纳米乳液的最小抑菌浓度为 3.2 mg/mL,而壳聚糖纳米乳液的最小抑菌浓度显著低于纳米乳液,为 0.2 mg/mL 左右(图 1)。也验证了抑菌圈的结果,说明经过壳聚糖包埋后,纳米乳液的抑菌能力提高。

3.3. 纳米乳液创伤皮肤促进愈合作用

茶树油具有显著的抑制微生物生长能力,因此被广泛用于个人护理产品中,例如牙膏和化妆品[9][10]。在本研究中,使用小鼠皮肤烫伤模型评估了茶树油纳米乳液(TNE)和壳聚糖包埋茶树油纳米乳液(CTNE)的创伤皮肤愈合效果。在实验期间,每两天测量一次体重和伤口组织的大小。结果显示,不同小鼠组之间的体重和伤口组织(瘢痕)的大小无显著差异(图 2 和图 3)。但是与其他组相比,经茶树油纳米乳液处理的小鼠的伤口组织较小,表明茶树油纳米乳液在一定程度上可以促进皮肤伤口愈合。

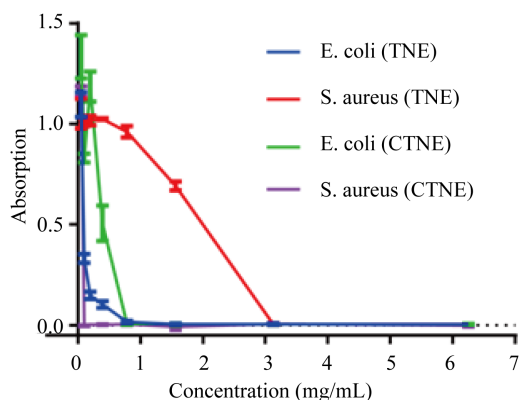


Figure 1. The minimal inhibitory concentration curve of tea tree oil nanoemulsion (TNE) and chitosan coated TNE (CTNE) to *E. coli* and *S. aureus*

图 1. 茶树油纳米乳液(TNE)和壳聚糖包埋茶树油纳米乳液(CTNE)对于大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的最小抑菌浓度曲线

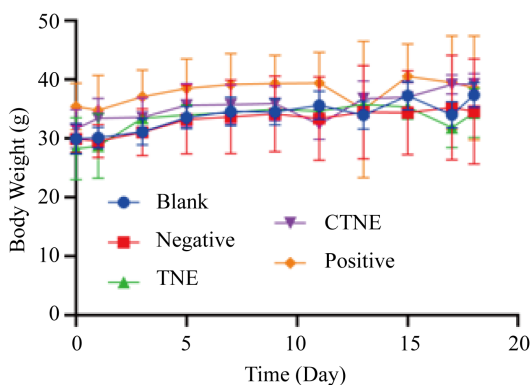


Figure 2. Body weight changes of skin trauma model mouse during treatment, blank is normal mice (without trauma treatment), negative is distilled water treated mice, TNE is tea tree oil nanoemulsion treatment group, CTNE is chitosan-coated tea tree oil nanoemulsion treatment group, positive for drug treatment group

图 2. 皮肤创伤模型小鼠处理过程中体重变化, blank 为正常小鼠(不进行创伤处理), negative 为蒸馏水处理小鼠, TNE 为茶树油纳米乳液处理组, CTNE 为壳聚糖包埋茶树油纳米乳液处理组, positive 为药物处理组

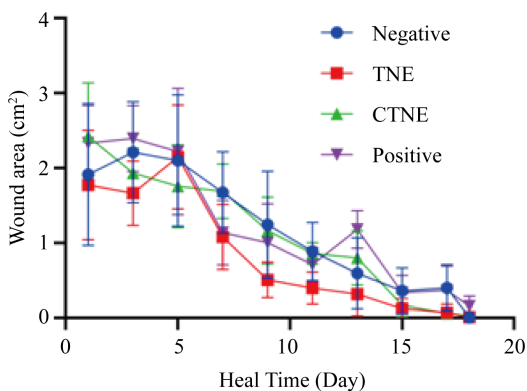


Figure 3. Wound area changes of skin trauma model mouse during treatment, negative is distilled water treated mice, TNE is tea tree oil nanoemulsion treatment group, CTNE is chitosan-coated tea tree oil nanoemulsion treatment group, positive for drug treatment group

图 3. 皮肤创伤模型小鼠处理过程中伤口面积变化, negative 为蒸馏水处理小鼠, TNE 为茶树油纳米乳液处理组, CTNE 为壳聚糖包埋茶树油纳米乳液处理组, positive 为药物处理组

另一方面, 经茶树油纳米乳液和壳聚糖茶树油纳米乳液处理的小鼠的瘢痕组织厚度小于阴性和阳性对照组。此外, 疤痕脱落后, H & E 染色后可发现新生表皮的组织形态学特征(图 4)也有一定的区别。发现阳性药物治疗小鼠的表皮比茶树油纳米乳液和壳聚糖包埋的茶树油纳米乳液治疗的小鼠表皮薄, 与正常小鼠皮肤结构相似。以上结果表明, 茶树油纳米乳液和壳聚糖包埋茶树油纳米乳液可以促进皮肤生长, 这可能是由于茶树油具有很强的抗微生物和抗炎能力[11]。在感染了金黄色葡萄球菌的人类伤口组织上直接进行茶树油治疗(浓度为 3.3%)可以提高治愈率并减少疤痕大小[12], 茶树油处理创伤皮肤还显著缩短治愈时间[13]。本研究结果表明, 茶树油纳米乳液也具有显著的伤口愈合作用, 这可能归因于其抗菌能力。

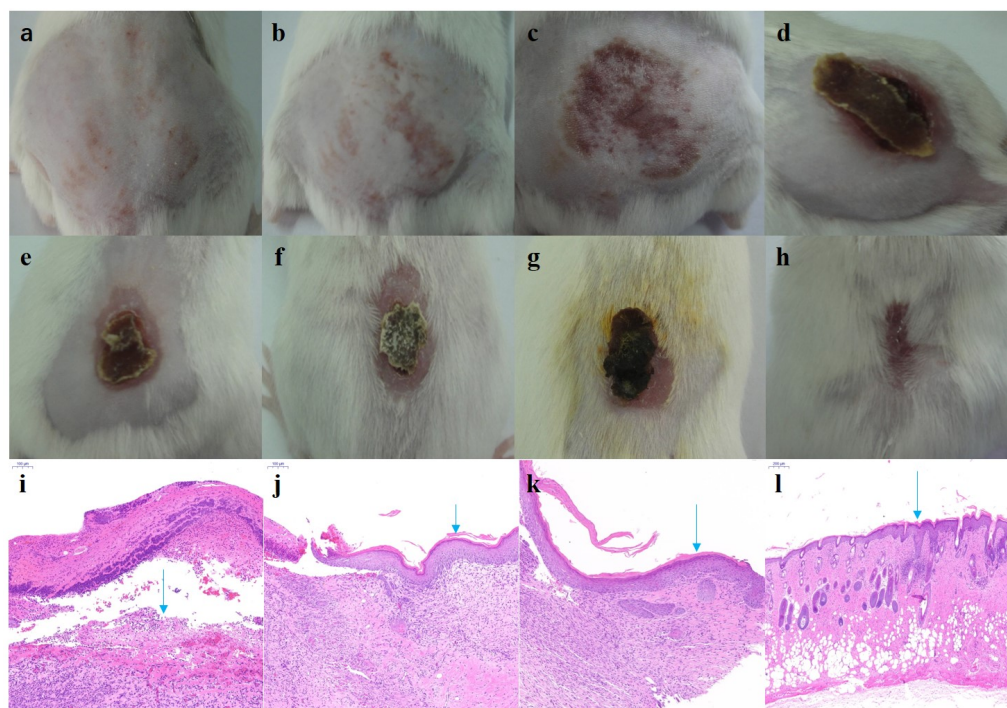


Figure 4. Representative pictures of skin trauma experiment process and skin tissue morphology: (a) mouse back skin after epilation; (b) mouse skin after 30 minutes of burns; (c) mouse skin after 2 hours of burns; (d) burns untreated scalded mice 1 week after initiation, used as negative control; (e) scalded mice treated with tea tree oil nanoemulsion for 1 week; (f) chitosan coated tea tree oil nanoemulsion treated for 1 week; (g) scalded mice treated with drug for 1 week; (h) skin appearance after scar healing; (i) histomorphological images of healing skin of drug treated mice; (j) histomorphological images of mouse skin treated by tea tree oil nanoemulsion; (k) histomorphological images of skin of mice treated by chitosan-coated tea tree oil nanoemulsion; (l) histomorphological images of skin healing of negative control mice, The arrow points to the new skin tissue; the magnification of the i-l microscope picture is 100 times

图 4. 皮肤创伤实验过程代表图片以及皮肤组织形态: (a) 脱毛后的小鼠背部皮肤; (b) 烫伤 30 分钟后对小鼠皮肤; (c) 烫伤 2 小时后对小鼠皮肤; (d) 烫伤开始 1 周后未经治疗的烫伤小鼠, 用作阴性对照; (e) 茶树油纳米乳液处理 1 周的烫伤小鼠; (f) 壳聚糖包埋茶树油纳米乳液处理 1 周的烫伤小鼠; (g) 药物治疗 1 周的烫伤小鼠; (h) 疤痕愈合后的皮肤外观; (i) 药物治疗小鼠的愈合皮肤的组织形态学图像; (j) 经茶树油纳米乳液处理的小鼠皮肤愈合的组织形态学图像; (k) 壳聚糖包埋茶树油纳米乳液治疗的小鼠的愈合皮肤的组织形态学图像; (l) 阴性对照小鼠皮肤愈合的组织形态学图像, 箭头指向新生皮肤组织; (i)-(l) 显微镜图片放大倍数为 100 倍

4. 结论

茶树油具有显著的抑菌和抗炎活性, 纳米乳液以茶树油作为油相, 将茶树油分散于水溶液中, 提高其水分散性和应用范围。制备的茶树油纳米乳液粒径小, 分布集中, 同时稳定性较高, 经过壳聚糖包埋

处理后平均粒径和分布没有显著变化。茶树油纳米乳液和壳聚糖包埋茶树油纳米乳液具有显著的抑菌活性, 可以抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长, 同时与未包埋的茶树油纳米乳液相比, 壳聚糖包埋茶树油纳米乳液的抑菌活性有所提高。茶树油纳米乳液和壳聚糖包埋的纳米乳液还可以促进皮肤伤口愈合, 改善新生皮肤组织。本研究结果表明纳米乳液可以作为茶树油应用的一种重要形态, 提高其抑菌等生物活性, 有助于扩大茶树油应用范围。

基金项目

合肥工业大学大学生创新创业校级项目, X201910359417。

参考文献

- [1] 杜光, 郑恒, 宗凯. 茶树油化学成分及抗菌作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(8): 462-463.
- [2] 王近近, 邵兴锋, 刘淑敏, 许凤, 王鸿飞. 茶树精油对灰葡萄胞霉生理功能的干扰研究[J]. 现代食品科技, 2016(6): 56-62.
- [3] 康波, 齐军茹, 杨晓泉, 廖劲松. 纳米乳液的制备及稳定性研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2008(3): 102-104.
- [4] 陈冬, 张晓阳, 刘尧政, 梁莉, 于国泳, 李全宏. 姜油纳米乳液超声波乳化制备工艺及其稳定性研究[J]. 农业机械学报, 2016(6 期), 250-258.
- [5] 秦文文, 梁剑平, 郝宝成, 尚若锋, 王学红, 黄鑫, 刘宇. 茶树油对 5 种常见致病菌的体外抑菌作用研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(21): 203-207.
- [6] 钟振声, 樊丽妃, 黄继兵. 引种互叶白千层茶树油的化学成分及抑菌活性[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2011(1): 57-61.
- [7] 任鹏, 官大威, 赵锐, 马文翔, 张书韬. 小鼠皮肤烫伤模型的建立[J]. 法医学杂志, 2012(2): 20-25.
- [8] 廖艳梅, 李小芳, 刘罗娜, 仲粒, 谢龙, 唐海龙, 张琳琳. 橙皮苷纳米乳液的制备及其稳定性研究[J]. 中草药, 2019, 50(10): 61-67.
- [9] Antignac, E., Nohynek, G.J., Re, T., Clouzeau, J. and Toutain, H. (2011) Safety of Botanical Ingredients in Personal Care Products/Cosmetics. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 324-341. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.022>
- [10] Carvalho, I.T., Estevinho, B.N. and Santos, L. (2016) Application of Microencapsulated Essential Oils in Cosmetic and Personal Healthcare Products—A Review. *International Journal of Cosmetic Science*, **38**, 109-119. <https://doi.org/10.1111/ics.12232>
- [11] Halcón, L. and Milkus, K. (2003) *Staphylococcus aureus* and Wounds: A Review of Tea Tree Oil as a Promising Antimicrobial. *American Journal of Infection Control*, **32**, 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.12.008>
- [12] Edmondson, M., Newall, N., Carville, K., Smith, J., Riley, T.V. and Carson, C.F. (2011) Uncontrolled, Open-Label, Pilot Study of Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil Solution in the Decolonisation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Positive Wounds and Its Influence on Wound Healing. *International Wound Journal*, **8**, 375-384. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00801.x>
- [13] Chin, K.B. and Cordell, B. (2013) The Effect of Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*) on Wound Healing Using a Dressing Model. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **19**, 942-945. <https://doi.org/10.1089/acm.2012.0787>